

Г.В. Зелінська

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», Київ, Україна

Ключові слова: папілярна карцинома щитоподібної залози, метастази, радіюодчутливість, фенотипічна гетерогенність, кістозна дегенерація, тиреоїдна пероксидаза, передопераційне прогнозування.

МОЖЛИВОСТІ ЦИТОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ В ПЕРЕДОПЕРАЦІЙНОМУ ПРОГНОЗУВАННІ РАДІОЙОДРЕЗИСТЕНТНОСТІ КЛІТИН ПАПІЛЯРНОГО РАКУ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

Мета: порівняльне дослідження субклональної структури популяцій тиреоцитів радіюодрезистентних та радіюодчутливих метастазів папілярного раку щитоподібної залози та виявлення цитологічних особливостей тиреоцитів, які можуть бути використані при розробці методів прогнозування розвитку радіюодрезистентності. **Об'єкт і методи:** цитоморфологічні та імуноцитохімічні дослідження проводили на матеріалі тонкогілкових пункційних аспіраційних біопсій 90 первинних папілярних карцином та їх метастазів, а також на матеріалі 122 метастазів, виявлених у післяопераційний період (97 — радіюодрезистентні, 25 — радіюодчутливі метастази). **Результати:** порівняльне дослідження цитологічних характеристик тиреоцитів у пунктатах метастазів виявило існування фенотипічної гетерогенності епітелію радіюодрезистентних метастазів порівняно з радіюодчутливими, що проявляється наявністю особливих клітинних субпопуляцій, які відсутні в первинних карциномах та радіюодчутливих метастазах. Уперше розроблено методи прогнозування радіюодрезистентності післяопераційних метастазів та ефективності радіюодтерапії на основі виявлення в пунктатах метастазів кістозної дегенерації та експресії тиреоїдної пероксидази. **Висновки:** для визначення тактики лікування (радіюодтерапія чи хірургічне втручання) на основі прогнозування радіюодрезистентності можуть бути використані показник частоти (%) експресії тиреоїдної пероксидази та виявлення цитологічних ознак кістозної дегенерації. Дослідження не окремих цитологічних та імуноцитохімічних характеристик клітин папілярного раку щитоподібної залози та їх метастазів, а комплексу фенотипічних ознак (об'єднання клітин у різні субпопуляції) є новітнім цитологічним підходом, який дозволяє прогнозувати радіюодрезистентність та агресивність папілярних карцином.

Показники темпу зростання захворюваності на рак щитоподібної залози (РЩЗ) вийшли на перше місце серед усіх злоякісних захворювань. Проте, на відміну від карцином інших локалізацій, РЩЗ в більшості випадків має сприятливий прогноз (20–30-річна виживаність перевищує 90%). Це стало можливим завдяки впровадженню в клінічну практику стандартного протоколу терапії, який включає хірургічне лікування, використання супресивної гормональної терапії та радіюодтерапії [1–5]. Ключовим моментом успішного лікування та діагностики диференційованого РЩЗ та його метастазів є використання високоефективного методу, який базується на унікальній здатності клітин щитоподібної залози (ЩЗ) уловлювати радіюод та використовувати його в синтезі тиреоїдних гормонів. Головною проблемою лікування хворих на РЩЗ є наявність радіюодрефрактерних (радіюодрезистентних) мета-

стазів (РЙРМ) у 4–20% пацієнтів із диференційованою тиреоїдною карциномою. При цьому пухлина не відповідає первинно на лікування радіюодом або згодом стає рефрактерною (резистентною) до нього. Втрата клітинами хворих на тиреоїдний рак здатності до накопичення радіюоду корелює з рівнем виживаності пацієнтів. При наявності віддалених РЙРМ середня медіана виживаності скорочується до 2,5–3,5 року [5–7]. Невидимі на скінтинграмах із використанням радіюоду РЙРМ можливо візуалізувати лише за допомогою додаткових методів дослідження (ультразвукове, рентгенологічне дослідження, комп'ютерна томографія, позитронно-емісійна томографія, поєднана з комп'ютерною томографією, магнітно-резонансна томографія). Тому важливо мати можливість раннього прогнозування розвитку радіюодрезистентності на тлі «благополучних» папілярних карцином (ПК), оскільки своєчасне ви-

явлення метастазів збільшує шанси на виживання хворого. Існують численні приклади успішного доопераційного прогнозування поведінки пухлин з метою вибору адекватної терапії на основі дослідження матеріалу тонкогілкових аспіраційних пункційних біопсій (ТАПБ) злякисних новоутворень різної локалізації (визначення гормонального статусу пухлин молочної залози, диференційна діагностика неходжкінських лімфом) [8].

Доопераційне прогнозування розвитку РЙРМ, на нашу думку, можливе за умов визначення морфологічних особливостей клітин при проведенні комплексного клініко-біологічного дослідження. За даними доступної літератури, тільки в небагатьох роботах представлено деякі гістологічні та імуноцитохімічні прояви агресивної поведінки РЩЗ [9–11]. Що стосується прикладів використання сучасних методів для доопераційного аналізу тиреоїдних пухлин, то з цією метою запропоновано використання виявлення можливих мутацій гена *BRAF* в клітинах пунктів тиреоїдних карцином. Але дані щодо використання цього маркера є досить суперечливими. Американська тиреоїдна асоціація (American Thyroid Association) не рекомендує використання його визначення в поточному прогнозуванні поведінки ПК [5, 12]. Крім того, методи молекулярної біології потребують занадто вартісного обладнання. Таким чином, відсутні уявлення щодо цитоморфологічного та імуноцитохімічного профілю РЙРМ папілярних карцином щитоподібної залози (ПКЩЗ). Практична відсутність досліджень пункційного матеріалу РЙРМ ПКЩЗ та унікальна можливість проведення такого аналізу на достатніх за обсягом групах хворих з РЙРМ та радіючутливими метастазами (РЙЧМ) спонукала нас до проведення цієї роботи.

Метою роботи було дослідження субкласональної структури популяції тиреоцитів пунктів РЙРМ порівняно з РЙЧМ та первинними ПКЩЗ за допомогою цитоморфологічних та імуноцитохімічних методів, виявлення цитологічних особливостей тиреоцитів, які корелюють з радіюдрезистентністю та можуть бути використаними при розробці методів доопераційного прогнозування розвитку РЙРМ ПКЩЗ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі використано матеріал, отриманий в результаті проведення ТАПБ новоутворень ЩЗ під контролем сонографії у пацієнтів обох статей віком 8–40 років, що проходили обстеження, хірургічне лікування та радіюдотерапію в клініці ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України». Дослідження проведено з використанням матеріалу ТАПБ у 90 хворих із ПК та при наявності метастазів, виявлених до операції, а також на матеріалі вивчення 122 метастазів, виявлених в післяопераційний період — після проведення тиреоїдектомії та радіюдотерапії (97 випадків — РЙРМ, 25 — РЙЧМ). Імуноцитохі-

мічні дослідження проводили на мазках пунктів, фіксованих метанолом та забарвлених за методом Романовського, після проведення реакції відновлення активності антигенів за методикою, розробленою в нашій лабораторії [13]. Проводили імуноцитохімічні реакції виявлення антигенів непрямим імунопероксидазним методом за допомогою МкАТ миші проти таких антигенів: тиреоглобуліну (Тг) — клон RBU/01 (Sigma, USA) та клон DAK-Tg 6 (DakoCytomation, Данія), панцитокератинів (цитокератини 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18, 19, Sigma, США), цитокератину 8 — клон H1 (DakoCytomation, Данія, клон M20, Sigma, США), цитокератину 17 — клон E3 (DakoCytomation, Данія), цитокератину 7 (clone OV-TL 12/30, Dako, Данія), молекул адгезії епітеліальних клітин (epCAM) (clone Ber-Ep4, Dako, Данія), макрофагальних антигенів (CD68) (clone EBM11, Dako, Данія). Статистичне опрацювання даних виконували за непараметричним методом Колмогорова — Смирнова, Манна — Уїтні та методом кореляційного аналізу. Розрахунки виконано в пакеті Statistica 7.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведене нами порівняльне дослідження цитологічних характеристик тиреоцитів у пунктах метастазів ПКЩЗ виявило існування фенотипічної гетерогенності епітелію РЙРМ порівняно з РЙЧМ. Фенотипічна гетерогенність популяції тиреоцитів метастазів проявляється наявністю різних субпопуляцій тиреоцитів, які відрізняються за цитологічними та імуноцитохімічними характеристиками від загальної популяції фолікулярного епітелію. Клітини з першим фенотипом мають округлу форму та чіткі межі, відрізняються вираженим світлозаломленням добре збереженої поверхні клітин. Вони виглядають світлими порівняно з іншими тиреоцитами та були названі «світлими», або S-клітинами. Клітини другого фенотипу відрізнялися від інших тиреоцитів наявністю в їх цитоплазмі базофільної округлої структури, що зникає після обробки препаратів рибонуклеазою, що свідчить про те, що вона містить РНК, та отримали назву МС-клітини (macula-cells) (рис. 1, 2). Епітеліальна природа клітин обох фенотипів була підтверджена позитивною імуноцитохімічною реакцією з антитілами проти цитокератинів та відсутністю реакції з антитілами проти антигенів CD68 та CD45, притаманних клітинам гістіоцитарно-макрофагального ряду. Цікаво, що цитоплазма МС-клітин реагує з антитілами проти Тг, а S-клітини не містять Тг. Проведені дослідження демонструють наявність S- і МС-клітин лише в пунктах РЙРМ, водночас в РЙЧМ вони відсутні, клітини субпопуляції S відсутні також у первинних ПК.

Особливістю цитологічної картини пунктів РЙРМ ПКЩЗ є наявність у 80% випадків кістозної рідини з гемосидерофагами (ознаки кістозної дегенерації), яка відсутня в пунктах усіх РЙЧМ

та наявна лише в 23% загальної популяції метастазів. Кореляційний аналіз демонструє, що зв'язок між радіоїодрезистентністю та наявністю кістозної дегенерації обернений та значимий (Фі-коефіцієнт кореляції дорівнює $-0,5$; т-статистичний коефіцієнт кореляції дорівнює $-0,7$). Запатентовано спосіб визначення цитологічної ознаки кістозної дегенерації в пунктах метастазів, виявлених у післяопераційний період, в якості передопераційного фактора прогнозу їх радіоїодрезистентності. У результаті проведеного дослідження показано, що фенотипічна гетерогенність популяції тиреоцитів, яка проявляється наявністю різних субпопуляцій клітин, трапляється в пунктах РЙРМ та відсутня в пунктах РЙЧМ ПКЩЗ. Таким чином, фенотипічну гетерогенність можна розглядати як цитологічний фактор прогнозування радіоїодрезистентності післяопераційних метастазів ПКЩЗ.

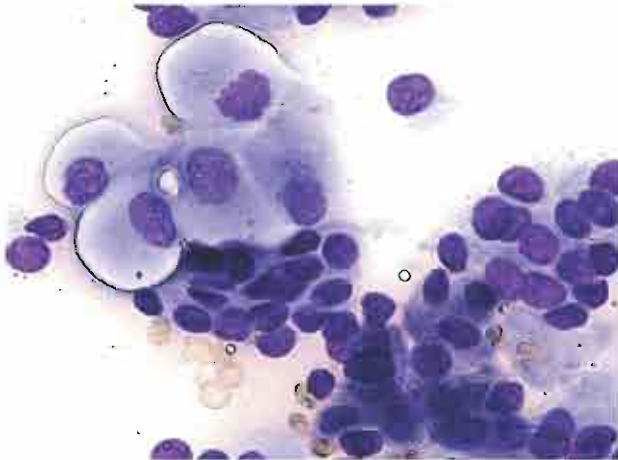


Рис. 1. Світлі клітини субпопуляції S в пунктах РЙРМ ПКЩЗ. Забарвлення за Романовським. Зб. $\times 40$



Рис. 2. Клітини субпопуляції MC в пунктах РЙРМ ПКЩЗ. Забарвлення за Романовським. Зб. $\times 40$

Етапи цитологічного дослідження особливостей РЙРМ ПКЩЗ зумовлені спробою виявити в клітинах пунктів порушення експресії факторів, необхідних не тільки для захоплення радіоїоду тиреоцитом, а й для його ретенції в клітинах тиреоїдного епітелію. Умовами ефективної акумуляції ^{131}I тиреоцитом є не тільки його захоплення клітиною, а й ефективний період напівжиття ізо-

топу. Важливий вплив на нього чинить період органіфікації йоду, який каталізується тиреоїдною пероксидазою (ТПО) [14]. Важливим клітинним фактором, який бере безпосередню участь у синтезі тиреоїдних гормонів, є також Тг. Водночас з аналізу доступних джерел літератури випливають суперечливі дані стосовно кореляції цих обох факторів та розвитку процесу радіоїодрезистентності тиреоїдних карцином [15, 16]. Тому наступним етапом дослідження цитологічних особливостей РЙРМ ПКЩЗ було імуноцитохімічне визначення експресії ТПО і Тг в пунктах групи РЙРМ порівняно з РЙЧМ.

Визначено статистично достовірну різницю між РЙРМ та РЙЧМ за відсотком тиреоцитів, що реагують з антитілами до ТПО у клітинах пунктів. Відповідно до непараметричного критерію Манна — Уїтні підтверджено альтернативну гіпотезу про наявні значущі відмінності (на рівні 0,001) між показниками двох груп ($p = 0,000011$). Якщо в пунктах усіх РЙЧМ виявлено високий відсоток клітин з експресією ТПО (47–90%), то в групі РЙРМ, навпаки, експресія ТПО була відсутня в 83% випадків. В останніх 17% метастазів лише 5–22% пухлинних клітин були імунопозитивними. Отже, вперше запропоновано імуноцитохімічне визначення експресії ТПО в якості прогностичного маркера РЙРМ, виявлених у післяопераційний період. Якщо в клітинах пункту метастазу не виявляється експресія ТПО, прогнозується радіоїодрезистентність метастазу, неефективність радіоїодтерапії та необхідність хірургічної ліквідації метастазу. Якщо частка ТПО-позитивних клітин перевищує 70%, прогнозується успішна радіоїодтерапія. Такий прогноз у виконанні та швидкий спосіб прогнозування радіоїодрезистентності ПКЩЗ та ефективності радіоїодтерапії був запатентований та використовується в практичній діяльності клініки нашого інституту [17]. Цей спосіб дозволяє визначити статус метастазів ПКЩЗ, виявлених у післяопераційний період, щодо радіоїоду ще до його використання, визначити адекватну тактику подальшої терапії (радіоїодтерапія чи хірургічне видалення метастазу) і позбавити застосування зайвих курсів радіоїодтерапії пацієнтів із РЙРМ або призначити додаткову радіоїодтерапію у випадках прогнозування її ефективності (рис. 3).

Що стосується порівняльного імуноцитохімічного визначення Тг у пунктах груп РЙРМ та РЙЧМ, то він виявився менш надійним предиктором радіоїодрезистентності. Хоча відсоток позитивно реагуючих клітин у пунктах РЙЧМ був переважно високим (68–100%), у 10% РЙРМ він також досягав 95%. Такі дані протирічать повідомленням про те, що всі пацієнти зі слабкою експресією Тг клітинами рецидиву були йоднегативними, та навряд чи можливе точне доопераційне прогнозування радіоїодрезистентності за рівнем експресії Тг у пунктах [18]. Враховуючи неможливість

доопераційного визначення чутливості до радіоходу метастазів тиреоїдного раку, виявлених у післяопераційний період за допомогою ультразвукового дослідження, розробка методів цитологічного прогнозування радіоїодрезистентності таких метастазів має велике значення.

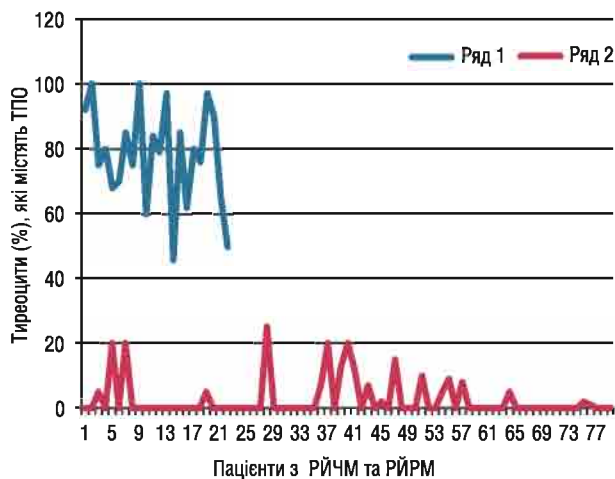


Рис. 3. Індивідуальні коливання відносної кількості тиреоцитів, які містять ТПО, в РЙЧМ (ряд 1) та РЙРМ ПКЩЗ (ряд 2)

ВИСНОВКИ

1. Вперше проведено дослідження субклональної структури популяції тиреоцитів пунктів РЙРМ порівняно з РЙЧМ за допомогою цитоморфологічних та імуноцитохімічних методів.

2. Продемонстрована фенотипічна гетерогенність тиреоцитів РЙРМ ПКЩЗ на відміну від РЙЧМ та поява типів клітин, які відсутні в первинних ПК та РЙЧМ, що може бути використано для передопераційного прогнозування радіоїодрезистентності ПКЩЗ.

3. Запропоновано використання виявлення цитологічних ознак кістозної дегенерації в пунктах метастазів ПКЩЗ в післяопераційний період для прогнозування їх радіоїодрезистентності і, відповідно, визначення тактики лікування пацієнтів (радіоїодтерапія чи хірургічне лікування).

4. Показана статистично достовірна різниця в експресії ТПО у пункційному матеріалі РЙРМ та РЙЧМ, на основі чого розроблено метод передопераційного прогнозування радіоїодрезистентності та ефективності радіоїодтерапії ПКЩЗ.

5. Показано, що імуноцитохімічне визначення експресії Тг в метастазах не може бути використано в передопераційному моніторингу радіоїодрезистентності ПКЩЗ.

6. Дослідження не окремих цитологічних та імуноцитохімічних ознак клітин ПКЩЗ та їх метастазів, а саме фенотипів клітин є новітнім цитологічним підходом, що дозволяє вивчати кореляцію радіоїодрезистентності та агресивної поведінки ПК з наявністю різних субпопуляцій тиреоцитів.

1. Dzepina D, Zurak K, Petric V, *et al.* Pathological characteristics and clinical perspectives of papillary thyroid cancer: study of 714 patients. *Eur Arch Otorhinolarygol* 2014; **71** (1): 41–8.

2. Lei S, Ding Z, Ge J, Zhao D. Association between prognostic factors and clinical outcome of well-differentiated thyroid carcinoma: a retrospective 10-year follow-up study. *Oncol Lett* 2015; **10** (3): 1749–54.

3. Markovina S, Grigsby PW, Schwarz JK, *et al.* Treatment approach, surveillance, and outcome of well-differentiated thyroid cancer in childhood and adolescence. *Thyroid* 2014; **24** (7): 1121–6.

4. Dadu R, Devine C, Hernandez M, *et al.* Role of salvage targeted therapy in differentiated thyroid cancer patients who failed first-line sorafenib. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; **99**: 2086–94.

5. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, *et al.* 2015 American Thyroid Association management guidelines for adults patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2016; **26** (1): 1–133.

6. Pacini F, Yasuhiro I, Luster M. Radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer: unmet needs and future directions. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2012; **7**(5): 541–4.

7. Pfister DG, Fagin JA. Refractory thyroid cancer: a paradigm shift in treatment is not far off. *J Clin Oncol* 2008; **26** (29): 4701–4.

8. Zelinskaya AV. The possibility of cytological diagnostics in preoperative prognosis of tumor behavior and the choice of adequate therapy. *Endocrinology* 2018; **23** (1): 47–53.

9. Deandreis D, Ghuzlan A, Lebouleux S, *et al.* Do histological, immunohistochemical, and metabolic (radioiodine and fluorodeoxyglucose uptakes) patterns of metastatic thyroid cancer correlate with patient outcome? *Endocr Relat Cancer* 2011; **1** (18): 159–69.

10. Castro MR, Bergert ER, Goellner JR, *et al.* Immunohistochemical analysis of sodium iodide symporter expression in metastatic differentiated thyroid cancer: correlation with radioiodine uptake. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**: 5627–32.

11. Min JJ, Chung JK, Lee Y, *et al.* Relationship between expression of the sodium/iodide symporter and (131)I uptake in recurrent lesions of differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Nucl Med* 2001; **28**: 639–45.

12. Xing M, Westra WH, Tufano RP, *et al.* BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **90** (12): 6373–9.

13. Bozhok YuM, Tavokina LV, Epstein EV. The new things in diagnostic of thyroid cancer. Optimal combination of morphological and immunocytochemistry research methods of punctious materials. *Medicinal announcer (USA)* 1996; **138** (1): 40–3.

14. Liu Ying Y, Marcel P, Stokkel L, *et al.* Bexarotene increases uptake of radioiodide in metastases of differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2006; **154**: 525–31.

15. Pulcrano M, Boukheris H, Talbot M, *et al.* Poorly differentiated follicular thyroid carcinoma: prognostic factors and relevance of the histological classification. *Thyroid* 2007; **17**: 639–46.

16. Dralle H, Schwarzrock R, Lang W, *et al.* Comparison of histology and immunohistochemistry with thyroglobulin serum levels and radioiodine uptake in recurrences and metastases of differentiated thyroid carcinomas. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1985; **108** (4): 504–10.

17. Zelinska HV. Method for prediction of effectiveness of radioiodine therapy of post-operative metastases of papillary cancer of thyroid gland (Pat. № 86375 UA). Publ. 25.12.2013. Bul. № 24 (in Ukrainain).

18. Chen Wang, Xin Zhang, Hui Li. Quantitative thyroglobulin response to radioactive iodine treatment in predicting radioactive iodine-refractory thyroid cancer with pulmonary metastasis *PLoS One* 2017; **12** (7): e0179664.

**THE POSSIBILITY OF CYTOLOGICAL
DIAGNOSTICS IN PREOPERATIVE
PROGNOSIS OF RADIOIODINE
RESISTANCE OF PAPILLARY THYROID
CANCER***A. V. Zelinska**SI «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology
and Metabolism of Academy of Medical Science
of Ukraine», Kyiv, Ukraine*

Summary. Objective: on the basis of detection of cytomorphological and immunocytochemical characteristics of thyrocytes of radioiodine resistant metastases of papillary thyroid carcinoma were developed methods of their preoperative prediction and efficiency of radioiodine therapy. **Object and methods:** cytomorphological and immunocytochemical studies using monoclonal antibody against thyroid peroxidase, thyroglobulin, cytokeratins 7,8, adhesion molecules of the epithelium were performed on the material of fine needle aspiration biopsy of 90 papillary thyroid carcinomas and their metastases and 122 metastases detected in the postoperative period (97 — radioiodine resistant metastases, 25 — radioiodine sensitive metastases). **Results:** comparative researches of cytological characteristics of thyrocytes of radioiodine resistant metastases was revealed, in contrast to radioiodine sensitive metastases, which are manifested by the presence of specific cell subpopulations that are absent in radioiodine sensitive metastases and primary papillary carcinomas. The correlation between the presence of cystic degeneration in punctuates of postoperative thyroid metastases and radioiodine resis-

tance was revealed. Based on this, a method for preoperative prediction of radioiodine resistance of postoperative metastases has been developed. For the first time, methods for predicting radioiodine resistance of postoperative metastases and the effectiveness of radioiodine therapy have been developed on the basis of detecting cystic degeneration metastases and expression of thyroid peroxidase in punctates. **Conclusions:** the frequency of thyroid peroxidase expression (%) and the detection of cytological signs of cystic degeneration can be used to determine the radioiodine resistance prediction method (radioiodine therapy or surgical intervention). Investigations of non-specific cytological and immunocytochemical characteristics of papillary thyroid carcinoma cells and their metastases, and the complex of phenotypic features (aggregation of cells in different subpopulations) are the latest cytological approach that allows predicting radioiodine resistance and aggressiveness of the papillary carcinomas.

Key Words: papillary thyroid carcinoma, metastases, radioiodine sensitivity, phenotypic heterogeneity, cystic degeneration, thyroid peroxidase, preoperative prognosis.

Адреса для листування:

Зелінська Г.В.

04114, Київ, вул. Вишгородська, 69

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин
ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

E-mail: Ann.zelinskaya@ukr.net

Отримано: 19.11.2018